

## 五、發明說明 ( / )

發明背景

使用培養基以培養微生物為已知技藝。一廣泛分類的培養基為已知，使用特別培養基通常可決定微生物是否可生長在特殊的環境。培養基通常被設計成提供所有的營養物微生物在其中成長時可使用，及可以液態，通常為肉湯，或固體，通常是膠。固體的培養基有特別用途因為它們可被使用以分離微生物混合物。

在正常用途，培養基是滅菌的（殺掉微生物污染）及然後放入滅菌盤或容器內，其然後被儲存於無菌環境以確保沒有微生物污染發生。滅菌是很重要，因其從培養基移除所有的競爭微生物是根本以確保任何觀察到生長只有從放入培養基表面的微生物的生長。

使用滅菌的種類主要是選擇及其來源。當由熱滅菌（高熱壓蒸氣滅菌）使用於很多狀況，但不是所有的培養基可直接如此處理。特別是，高溫通常會使很多蛋白質及其它存於培養基的化合物變性，使微生物的成長無效。

使用於此技藝的其他滅菌技術為把培養基暴露於游離輻射以殺死任何微生物污染為可能。這由第一以製備培養基方法完成，調配入適當容器（例如盤子），及暴露包裝好的培養基以游離照射適當的強度及時間以獲得滅菌的培養基包。這包，被滅菌，可儲存於更長的時間而不會變壞。

## 五、發明說明 (&gt;)

當如此的滅菌法被使用於一些申請案，包括醫用儀器的滅菌，它並不廣泛使用於培養基的滅菌。這主要是因為游離輻射加強了分解產物於培養內的形成，其可使微生物的生長變壞，更進一步，在很多例子暴露於游離照射導致固體瓊脂成份變質，認定是如此培養基對其所申請太軟。為了這個理由，高熱蒸氣滅菌為這種培養基的滅菌方法。

Eisenberg等在美國專利 4,071,412 敘述生產培養基以輻射滅菌的方法，以加入稱之“輻射保護劑的組成物，以預防產品變質形成毒性物質。這些輻射保護劑的特別例子為指示劑，維他命，及酵素，所有均可預防形成某些毒性產物於輻射照射時。這些專利報導了一些特殊的培養基在加入所述輻射保護劑下大大增加了安定性。

然而，使用如此的輻射保護劑並不適合於所有的培養基。例如，使用在環境取樣裝置如接觸盤（例如，RODAC<sup>®</sup> 盤）必需依然為固體及保持其功能。使用接觸盤以獲得微生物污染的樣品在不同點於一室、處理線，或其它環境。在其使用，接觸盤的蓋子被移開，及培養基的表面被壓以取樣。這盤然後被從表面移開，再蓋上，及培育一段時間，在目光檢視出現菌落後，其為指出有微生物污染。菌落可被檢查，計算，鑑定，等。接觸盤也可被使用取空氣的微生物污染，使用特別設計的裝置為了這個申請。

## 五、發明說明 (3)

不幸地，當這種盤子暴露於游離輻射，凝膠及表面的整體變成太軟。凝膠強度的損失，使培養基為接觸的應用變成無效。

更進一步，如此盤子常包含中和消毒劑的物質通常發現於取樣的表面。中和這些消毒劑是必需的，如同它們存在可抑制微生物生長。如此化合物通常與酵素作用干擾如使用在 '412 專利，以接觸盤使這些方法無效。

存在一真實的需要，因此，為了環境取樣培養基其可由游離輻射消毒，其將維持它們凝膠強度及不產生毒性物質其將干擾微生物生長。

發明概要

因此本發明的目標以呈視適合的培養基以使用在環境取樣裝置其可由游離輻射消毒滅菌。本發明更進一步的目標是，呈視一種製備單一劑型滅菌培養基方法，以使用在接觸盤。

上述及相關的目標由本發明培養基達成。這些培養基包括黃豆酪胺消化瓊脂（例如 Trypticase<sup>®</sup> 黃瓊脂由 Becton Dickinson Microbiology 公司出產）包括添加物其中和消毒劑（較佳地卵磷脂及聚山梨酸鹽 80）。此型瓊脂如 Trypticase<sup>®</sup> 黃瓊脂與卵磷脂及聚山梨酸鹽 80 為 Becton Dickinson 所出產。已發現這些培養基由添加酵母提取物，瓊脂及調整 pH 至 7.4 的改良，結果培養基可由游離輻射滅菌及仍然可保有生長及保持滿意的凝膠

## 五、發明說明 (4)

強度。更進一步的預期其他常使用於環境取樣裝置如 Lethen 瓊脂及標準方法瓊脂含卵磷脂及聚山梨酸鹽 80，可被認為以相同方法改良是穩定的。

如此培養基，當由游離輻射滅菌，發現有儲存至少 4 個月安定，支持微生物生長及新鮮培養基，及在如此儲存由高熱壓滅菌的培養基。

本發明的詳細說明

本發明的培養基包括改良的黃豆酪朊消化瓊脂，其包含中和消毒劑的添加劑（較佳的卵磷脂及聚山梨酸鹽 80）。這個改良可由添加酵母提取物，瓊脂，及調整 pH 值至 7.4 而達成。

加入的酵母提取物為普通酵母提取物，及加入之濃度為每升 3-10 克，較佳為每升 4-8 克，及最佳為每升 5 克，瓊脂（較佳為細菌學等的瓊脂）為普通（但不是必需）以相同之濃度加入，及較佳以每升 5 克加入。pH 值最好調至 7.4，但發現 pH 值的範圍 7.2-7.6 也有相同的結果。使用 0.1N NaOH 或  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  調整 pH 值為較佳。 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的特別優點在於其可與乾培養基混合在凝膠製備前，避免分離中和步驟的需要。

這些改良培養基可由高熱壓消毒滅菌，但其亦可由以游離輻射照射消毒。較佳使用的游離輻射是伽瑪輻射，但使用其他型的伽瑪輻射亦可例如 X-光及適當強度的電子束，唯一的規格是適當強度輻射在合理的一段時間內

## 五、發明說明 (5)

達成滅菌作用。較佳的伽瑪照射源為銫 ( $Cs^{137}$ ) 及鈷 ( $Co^{60}$ )。

在正常使用，製備的培養基被倒入環境取樣裝置，較佳的接觸盤其是密閉及封成一包。這包然後暴露於游離輻射。在這個方法，一清潔消毒包包括單一裝置，或多種裝置，獲得及這包可被儲存直到需要使用。當室溫儲存是可能，較佳是裝置可儲存於  $2-8^{\circ}C$ ，以增大其儲存期。發現培養基，因此被滅菌，可儲存在這個溫度大約 4 個月而不會變質。

這個裝置，包括滅菌培養基，可被使用於所需之申請。本發明較佳的主體為這裝置是接觸盤。在正常使用，盤蓋被移開，培養基的表面置於或暴露於所取樣的環境。在移開盤之後立即，蓋子被換掉，及這系統被培養以測定是否有微生物生長。發現這發明的盤沒有存在對大多數微生物有意義少的生長當與高壓熱滅菌培養基比較時。更進一步，本發明的培養基將中和於被取樣表面的消毒劑。因此，這發明的盤可被使用於所有的應用其接觸盤將被正常使用的。

例

下列例子證實某些本發明較佳本體，但不用來證實所有的本發明實質。

例 1：添加劑效果的比較

評估不同的添加劑及不同量之添加劑於培養基的效果

## 五、發明說明 (b)

，一系列的實驗可使用 Becton Dickinson Trypticase<sup>®</sup> 含卵磷脂及聚山梨酸 80 (TSA-LP) 黃瓊脂，及過氧化氫酶，或酵母抽取物及細菌學等級瓊脂的另外添加劑。在每一個實驗，去水的 TSA-LP 的製備是根據標籤說明及由添加劑改良。pH 然後以 0.1N NaOH 被調至 7.4。

培養基置於滅菌盤，其被應用，暴露於  $Co^{60}$  射源的伽瑪射線，及培養與金黃色葡萄球菌 ATCC 25923 或釀膿葡萄球菌 ATCC 19615 使用 0.1 毫升有活細胞預期可產生 30-300 CFU (菌落形成單位)。每一個測試培養 2 盤及其結果以平均 CFU/盤表示及平均菌落直徑以毫米 (mm) 表示，在 10-24 小時於 35°C 培養後。結果列於表 I

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線

## 五、發明說明 (7)

表 I  
比較添加劑實驗的結果

| 輻射劑量<br>(Mrad) | 添           |       | 結 果     |            |        |            |
|----------------|-------------|-------|---------|------------|--------|------------|
|                | 瓊脂<br>(g/L) | 其它    | 金黃色葡萄球菌 |            | 醃膜葡萄球菌 |            |
|                |             |       | CFU     | 大小<br>(mm) | CFU    | 大小<br>(mm) |
| 無              | 0           | 無     | 192     | 2.1        | 95     | 1.4        |
|                | 0           | 過氧化氫酶 | 232     | 2.2        | 77     | 1.2        |
|                | 0           | 酵母抽取物 | 212     | 2.3        | 82     | 2.8        |
| 0.8            | 3           | 無     | 173     | 1.6        | 96     | 1.1        |
|                | 3           | 過氧化氫酶 | 190     | 1.8        | 85     | 0.7        |
|                | 3           | 酵母抽取物 | 170     | 1.8        | 69     | 2.7        |
| 3.2            | 6           | 無     | 179     | 1.0        | 30     | <0.3       |
|                | 6           | 過氧化氫酶 | 225     | 1.3        | 100    | 0.4        |
|                | 6           | 酵母抽取物 | 196     | 1.4        | 95     | 1.7        |

## 註

a 啓始瓊脂濃度 (沒有添加劑) 為 15g/L

b 過氧化氫酶加至 100 mg/L濃度

c 酵母抽取物加至 5 g/L濃度

如結果所示，在零及低 (0.8 Mrad) 輻射劑量，CFU 並未由任何添加劑有意義加強。然而，在 3.2 Mrad劑量

## 五、發明說明 (8)

， 酵母抽取物及過氧化氫酶存在加強恢復 (CFU) 是在與只有瓊脂比較下。更進一步，在所有的三個系列，含酵母抽取物的培養基存在加強生長，為較大平均菌落由釀膿葡萄球菌證實。

例 2. 使用不同菌株

在這一系列的實驗，二盤純 TSA-LP 及 TSA-LP 由加入 5 g/L 添加瓊脂及酵母抽取物及調整 pH 至 7.4 以 0.1N NaOH (改良 TSA-LP) 的與列於例 1 的微生物培養。其結果列於表 II。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線

## 五、發明說明 (9)

表 II

| 生物體                        | TSA-LP |              | 改良 TSA-LP |              |                 |              |
|----------------------------|--------|--------------|-----------|--------------|-----------------|--------------|
|                            | CFU    | 菌落大小<br>(mm) | 無照射       |              | 照射 <sup>a</sup> |              |
|                            | CFU    | 菌落大小<br>(mm) | CFU       | 菌落大小<br>(mm) | CFU             | 菌落大小<br>(mm) |
| 枯草桿菌<br>(植物的)<br>ATCC 6633 | 65     | 3.7          | 52        | 5.9          | 31              | 4.4          |
| 金黃色葡萄<br>球菌<br>ATCC 25923  | 55     | 1.9          | 57        | 1.9          | 47              | 1.8          |
| 腸球菌<br>ATCC 29212          | 65     | 1.1          | 65        | 1.3          | 69              | 1.3          |
| 鼠傷寒桿菌<br>ATCC 13311        | 103    | 2.5          | 98        | 2.8          | 105             | 2.6          |
| 藤黃微球菌<br>ATCC 9341         | 48     | 0.8          | 47        | 0.8          | 61              | 0.9          |
| 白色念珠菌<br>BDMS 001          | 7      | 2.3          | 5         | 1.9          | 6               | 1.9          |
| 醃臘葡萄球菌<br>ATCC 19615       | 69     | 0.7          | 71        | 1.2          | 66              | 1.0          |
| 綠膿桿菌<br>ATCC 10145         | 140    | 2.2          | 127       | 2.1          | 122             | 1.9          |
| 黑麴菌<br>ATCC 16404          |        | 生長           |           | 生長           |                 | 生長           |

註

<sup>a</sup> 由 Cs<sup>137</sup> 射源 1.5 Mrad

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線



## 五、發明說明 (11)

表 III

| 生物體                        | 儲存培養基 <sup>b</sup> |              |        |              |              |     |                 |     |
|----------------------------|--------------------|--------------|--------|--------------|--------------|-----|-----------------|-----|
|                            | 新鮮 TSA-LP          |              | TSA-LP |              | 改良 TSA-LP    |     |                 |     |
|                            | CFU                | 菌落大小<br>(mm) | CFU    | 菌落大小<br>(mm) | 無照射          |     | 照射 <sup>a</sup> |     |
|                            |                    |              |        | CFU          | 菌落大小<br>(mm) | CFU | 菌落大小<br>(mm)    |     |
| 枯草桿菌<br>(植物的)<br>ATCC 6633 | 68                 | 2.2          | 21     | 1.4          | 26           | 2.5 | 57              | 2.9 |
| 枯草桿菌<br>(孢子的)<br>ATCC 6633 | 280                | 1.9          | 283    | 2.3          | 263          | 3.3 | 243             | 3.1 |
| 金黃色葡萄<br>球菌<br>ATCC 25923  | 64                 | 1.8          | 67     | 1.6          | 72           | 1.8 | 65              | 1.6 |
| 綠膿桿菌<br>ATCC 10145         | 80                 | 2.0          | 78     | 3.0          | 81           | 2.6 | 69              | 2.5 |
| 鼠傷寒桿菌<br>ATCC 13311        | 80                 | 2.9          | 80     | 2.4          | 76           | 2.5 | 88              | 2.5 |
| 醃膿葡萄球菌<br>ATCC 19615       | 70                 | 0.8          | 77     | 0.6          | 86           | 1.0 | 80              | 1.2 |
| 白色念珠菌<br>BDMS 001          | 425                | 0.9          | 335    | 0.7          | 375          | 0.8 | 322             | 0.7 |
| 腸球菌<br>ATCC 29212          | 43                 | 1.5          | 44     | 1.3          | 43           | 1.7 | 63              | 1.3 |
| 藤黃微球菌<br>ATCC 9341         | 480                | 0.8          | 475    | 0.7          | 458          | 0.8 | 480             | 0.7 |
| 黑麴菌<br>ATCC 16404          | 生長                 |              | 生長     |              | 生長           |     | 生長              |     |

註 a 由 Cs<sup>137</sup> 射源的 1.5Mrad

b 儲存 4 個月 2-8°C

## 五、發明說明 (12)

如表所示，儲存的培養基有較大恢復及大小，除了枯草桿菌的植物細胞，當照射時其真實表示有意義增加恢復。

例 3 中和效力

四級鍍化合物的中和效力由使用 Hoffmann 及 Phillips 試驗測定 (Ann N.Y. acad Sci. 53 第 59-65 頁)。簡單說，盤以金黃色葡萄球菌 ATCC 65389 培養，及紙盤 (12 毫米直徑) 以 0.08 毫升苯氧溶液，於濃度 8, 4, 2, 1, 0.5 或 0.25 mg/ml 置於表面。每一盤包括 3 個不同濃度的小圓洞及每一個濃度測試於 3 個盤。在 24 小時後培養在 25°C，每一個抑制區大小被測定。使用直線迴歸 (對數濃度與區直徑呈直線關係)，需要濃度以生長抑制區大小被計算出；這是中和能力於其結果列於表 IV。

表 IV

| 培養基       | 中和效能            |               |                 |
|-----------|-----------------|---------------|-----------------|
|           | 照射 <sup>a</sup> | 新鮮<br>(mg/ml) | 儲存 <sup>b</sup> |
| TSA-LP    | 無               | 0.255         | 0.234           |
| 改良 TSA-LP | 無               | 0.253         | 0.262           |
| 改良 TSA-LP | 有               | 0.264         | 0.281           |

註

a 由 Cs<sup>137</sup> 射源的 1.5 Mrad

b 儲存於 2-8°C 4 個月

## 五、發明說明 (13)

如表所示，所有的培養基存在相似結果，指出照射過培養基存有與無照射培養基的微生物生長。

例 4 凝膠強度

凝膠強度由 stoloff 方法測度 (Fishery leaflet 306, 美國內政部)。結果列於表 V

表 V

| 培養基       | 凝 膠 強 度          |                       |                       |
|-----------|------------------|-----------------------|-----------------------|
|           | 照 射 <sup>a</sup> | 新 鮮<br>(mg/ml)        | 儲 存 <sup>b</sup>      |
| TSA-LP    | 無                | 569 g/cm <sup>2</sup> | 547 g/cm <sup>2</sup> |
| 改良 TSA-LP | 無                | 808 g/cm <sup>2</sup> | 849 g/cm <sup>2</sup> |
| 改良 TSA-LP | 有                | 618 g/cm <sup>2</sup> | 593 g/cm <sup>2</sup> |

註

a 由 Cs<sup>137</sup> 射源的 1.5Mrad

b 儲存 4 個月 2-8°C

如表所示，改良的 TSA-LP 有較高凝膠強度比標準（新鮮）培養基。在照射後，改良的培養基其凝膠強度與標準的相比較。

很明顯的，很多的改良及本發明的變異在此可達成而沒有分開其精神與其範圍。所述的特別實體以實例表示及本發明只有以所附的申請專利範圍限制。

## 四、中文發明摘要(發明之名稱：)

適合接觸盤取樣之浮離照射可滅菌培養介質

一種培養基適合使用於環境取樣設備，其揭示培養基由游離照射滅菌。培養基包括黃豆酪蛋白消化瓊脂，包含中和滅菌試劑，其以添加瓊脂及酵母提取物為改良。所得培養基可由游離照射滅菌而不會有害的效應。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

英文發明摘要(發明之名稱： Ionizing Irradiation Sterilizable Culture Medium  
Suitable for Use in Contact Plates

A culture medium suitable for use in environmental sampling devices, which medium can be sterilized by ionizing radiation, is disclosed. The medium comprises a Soybean Casein digest agar, containing agents to neutralize disinfectants, which is modified by the addition of agar and yeast extract. The resultant medium can be sterilized by ionizing radiation without deleterious effects.

附註：本案已向

美 國(地區) 申請專利，申請日期：

案號：

1991年3月19日 案號：672,206

201791

|      |           |
|------|-----------|
| 申請日期 | 87.1.18   |
| 案 號  | 81100350  |
| 類 別  | C12N 1/20 |

修正 本81年12月11日  
補充

公 告 本

A4  
C4

(以上各欄由本局填註)

| 發明 專 利 說 明 書 (81年 12月 修正) |            |  |
|---------------------------|------------|--|
| 一、發明名稱                    | 中文         | 適合接觸盤取樣之浮離照射可滅菌培養介質  |
|                           | 英文         | Ionizing Irradiation Sterilizable Culture Medium Suitable for Use in Contact Plates          |
| 二、發明人                     | 姓名         | 1. 喬治 L · 伊文斯 George L. Evans<br>2. 佛萊德瑞克 J · 馬西克 Frederic J. Marsik<br>3. 伊里 (伊席特) 艾森伯格     |
|                           | 籍貫 (國籍)    | Eli (Eshet) Eisenberg<br>1. 美國                      2. 美國                      3. 以色列        |
|                           | 住、居所       | 1. 美國馬里蘭州 21030 卡基斯別墅馬爾寇姆廣場 10301-1號<br>2. 美國賓夕法尼亞州 17349 新自由市基塞路 6 號<br>3. 以色列泰爾-亞威伯拉街 54 號 |
| 三、申請人                     | 姓名 (名稱)    | 貝登狄金森公司<br>Becton, Dickinson and Company   |
|                           | 籍貫 (國籍)    | 美國   |
|                           | 住、居所 (事務所) | 美國新澤西州法蘭克林湖萬貝登道  |
|                           | 代表人姓名      | 雷蒙得 P · 奧木勒<br>R.P. Ohlmuller  |

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝 訂 線

201783  
公告 本  
修正  
補充  
本81年12月11日

A7  
B7  
C7  
D7

六、申請專利範圍

第 81100350 號「適合接觸盤取樣之浮離照射可滅菌培養介質」專利案 (81年 12月 修正)

1. 一個適於使用在接觸盤的微生物培養基，其包括瓊脂及一種或多種添加劑以中和消毒劑，改良之處包括在含所述培養基的有效量瓊脂及酵母提取物，其 pH 為 7.2~7.6，培養基可由游離輻射滅菌及維持它的能力以維持微生物生長與凝膠強度；其中瓊脂為黃豆酪朊消化瓊脂；其中添加劑是卵磷脂及聚山梨酸鹽 80；其中瓊脂及酵母提取物每一個存在濃度為 3~10 克/升。
2. 如申請專利範圍第 1 項的微生物培養基，其中瓊脂為 Letheen 瓊脂。
3. 如申請專利範圍第 1 項的微生物培養基，其中瓊脂為標準方法瓊脂。
4. 如申請專利範圍第 1 項的微生物培養基，其中瓊脂為細菌學級瓊脂。
5. 如申請專利範圍第 1 項的微生物培養基，其中瓊脂及酵母提取物每一個存在濃度為 5 克/升。
6. 如申請專利範圍第 1 項的微生物培養基，其中 pH 是以添加 NaOH 或 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 調整。
7. 如申請專利範圍第 1 項的微生物培養基，其中 pH 是 7.4。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝  
訂  
線